

Pewarnaan Kromosom dan Pemanfaatannya dalam Penentuan Tingkat Ploidi Eksplan Hasil Kultur Anter *Anthurium*

Winarto, B.

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

Naskah diterima tanggal 16 September 2010 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 20 April 2011

ABSTRAK. Metode pewarnaan Kromosom yang optimal merupakan prasarat penting dalam penentuan level ploidi tanaman hasil kultur anter, termasuk variasi eksplan hasil kultur anter *Anthurium*. Aplikasi dan modifikasi metode pewarnaan kromosom pada berbagai eksplan dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias dari bulan Februari sampai dengan Agustus 2009 untuk mengetahui keragaman dan tingkat ploidi regeneran hasil kultur anter *Anthurium*. Penelitian bertujuan mendapatkan metode pewarnaan kromosom dan modifikasinya, jenis eksplan dan akar yang sesuai untuk mempelajari tingkat ploidi regeneran hasil kultur anter *Anthurium*. Bahan yang digunakan ialah kalus, pucuk tunas, dan ujung akar udara. Penelitian terdiri atas tiga kegiatan, yaitu (1) modifikasi metode pewarnaan kromosom, (2) seleksi eksplan yang sesuai untuk pewarnaan kromosom, dan (3) optimasi metode pewarnaan kromosom terseleksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ujung akar dan akar yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung 1% arang aktif merupakan jenis eksplan dan akar yang sesuai untuk mendapatkan hasil pewarnaan kromosom yang baik. Modifikasi metode pewarnaan kromosom dengan pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat glasial 45% (3:1, v/v) selama 10 menit pada suhu 60°C dan perlakuan aseto-orcein selama 15 menit merupakan metode pewarnaan kromosom yang lebih baik dalam menghasilkan obyek kromosom yang mudah dihitung. Penerapan metode pewarnaan kromosom pada kultur anter *Anthurium* dapat memisahkan tingkat ploidi regeneran. Pada penelitian ini rasio ploidi regeneran kultur anter ialah 33,5% haploid, 62,7% diploid, dan 5,7% triploid. Metode pewarnaan kromosom yang berhasil dikembangkan dalam penelitian ini sangat bermanfaat dalam pengembangan teknologi haploid pada jenis Araceae yang lain.

Katakunci: *Anthurium andraeanum*; Pewarnaan kromosom; Ploidi; Kalus; Ujung akar

ABSTRACT. Winarto, B. 2011. **Chromosome Staining and Its Application on Determination of the Ploidy Level of Explants Derived from Anther Culture of *Anthurium*.** Optimal chromosome staining method is important pre-requisite in determination of plant ploidy level derived from anther culture, involving varied explants regenerated from *Anthurium* anther culture. Application and modification of chromosome staining methods on different explants were conducted at the Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from February to August 2009 for determination of the ploidy level of regenerants derived from anther culture of *Anthurium*. The aim of this research was to determine the chromosome staining method and its modifications, type of explant and root suitable to study the ploidy level of explants derived from anther culture of *Anthurium*. Callus, shoot tips, and root tips were utilized in the experiment. The research was consisted of three experiments, i.e. (1) modification of chromosome staining methods (2) selection of explants suitable for chromosome staining, and (3) improvement of the selected chromosome staining method. Results of the study indicated that root tips and roots cultured on medium containing 1% active charcoal were the most appropriate explants and the root type in obtaining better chromosome staining results. The modification method with root tip boiled in 1N HCl : 45% of acetic acid glacial (3:1, v/v) for 10 minutes in 60°C and aceto-orcein treatment for 15 minutes gave appropriate chromosome staining results exhibited clearer chromosome pictures and was easy to be counted. The application of chromosome staining on anther culture of *Anthurium* was able to distinguish the ploidy level of regenerants. Ploidy ratio of regenerants derived from anther culture was 33.5% of haploid, 62.7% of diploid, and 5.7% of triploid. Chromosome staining method resulted from the study give high benefit in developing haploid technologies on other Araceae plants.

Keywords: *Anthurium andraeanum*; Chromosome staining; Ploidy; Callus; Root tip

Jumlah kromosom dari 95 spesies *Anthurium* dianalisis dan dilaporkan oleh beberapa orang peneliti. Kisaran jumlah kromosom bervariasi dari $2n = 24$ hingga 66, dan jumlah kromosom 30 ialah jumlah yang paling umum ditemukan (Sheffer dan Croat 1983). Dari hasil penelitian tersebut juga diketahui bahwa jumlah kromosom somatik membentuk empat seri poliploid dari 20-40-60, 24-48-84, 28-56, dan 30-60-90-

hingga 124. Kromosom *Anthurium* umumnya terdiri atas empat kromosom metacentrik atau submetacentrik besar, dua kromosom akosentrik besar, dua kromosom satelit, dan 22 kromosom yang lebih kecil (Marutani *et al.* 1993).

Jumlah kromosom somatik *Anthurium andraeanum* ialah $2n = 30$ dan 32. Karyotipe *A. andraeanum* cv. Kaumana dan cv. Uniwai memiliki kromosom terdiri atas empat kromosom

metasentrik yang besar, dua kromosom satelit besar yang sebanding dan 24 kromosom yang lebih kecil (Kaneko dan Kamemoto 1978). Uji lanjut kromosom *A. andraeanum* cv. Uniwai diperoleh $2n = 30$, yang terdiri atas empat kromosom metasentrik atau submetasentrik yang besar, dua kromosom akosentrik besar yang sebanding, dua kromosom satelit, dan 22 kromosom yang kecil serta kromosom akosentrik ini bersifat spesifik, sedangkan pada sel-sel induk polen pada tahap prometafase I untuk seluruh takson, kromosom berjumlah 15 pasang (Marutani *et al.* 1993).

Analisis sitologi kromosom pada *Anthurium* umumnya dilakukan menggunakan teknik penghitungan jumlah kromosom pada ujung akar yang aktif secara fisiologis (Marutani dan Kamemoto 1983, Marutani *et al.* 1993). Meskipun belum memberikan hasil yang maksimal, metode penghitungan jumlah kromosom Darnaedi (1991) juga diaplikasikan pada eksplan hasil kultur anter *Anthurium* (Rachmawati *et al.* 2007). Teknik lain yang juga dapat digunakan pada skala in vitro ialah penghitungan jumlah kromosom pada kalus dan daun muda (Fukui 1996), tetapi teknik ini belum pernah diaplikasikan pada kalus dan eksplan hasil kultur anter *Anthurium*. Aplikasi, modifikasi metode pewarnaan kromosom dan seleksi eksplan memiliki arti yang sangat penting dalam kultur anter *Anthurium* terkait dengan penentuan variasi level ploidi tanaman yang dihasilkannya.

Analisis sitologi eksplan hasil kultur anter *Anthurium* pada level in vitro sangat diperlukan untuk analisis level ploidi dalam pengembangan teknologi haploid pada *Anthurium*. Keberhasilan pengungkapan level ploidi sangat menentukan arah pengembangan tanaman, khususnya tanaman haploid, terkait dengan perbanyakan eksplan, penyiapan planlet, penggandaan kromosom hingga produksi tanaman haploid ganda. Pada beberapa penelitian sebelumnya diketahui bahwa kultur anter *Anthurium* menghasilkan variasi warna kalus, kecepatan pertumbuhan dan regenerasinya, morfologi daun dan akar, serta tipe pertumbuhan (Winarto 2009). Variasi ini diduga juga mengindikasikan adanya keragaman level ploidi.

Dalam penelitian ini dilakukan aplikasi dan modifikasi metode pewarnaan kromosom pada jenis eksplan yang berbeda untuk mempelajari keragaman sitologi eksplan yang dihasilkan

melalui kultur anter *Anthurium*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan metode pewarnaan kromosom, jenis eksplan, dan akar yang sesuai untuk mempelajari keragaman level ploidi regeneran hasil kultur anter *Anthurium*. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah bahwa minimal terdapat satu metode pewarnaan kromosom, jenis eksplan, dan akar yang sesuai untuk mempelajari keragaman level ploidi regeneran hasil kultur anter pada *Anthurium*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

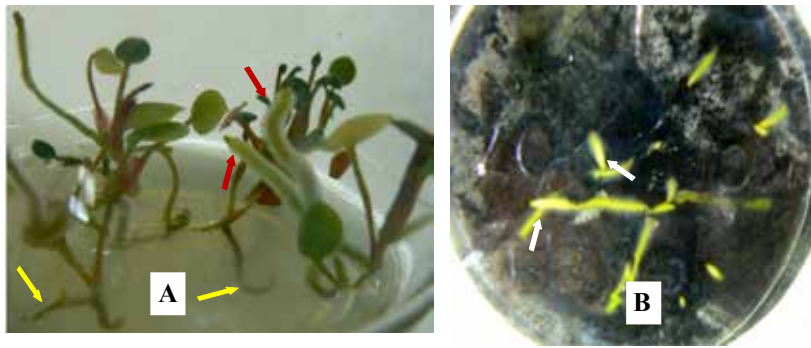
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung, Cianjur dari bulan Februari sampai dengan Agustus 2009.

Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian di antaranya ialah kalus, ujung tunas, dan akar hasil kultur anter *A. andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical. Selain itu digunakan pula media kultur in vitro dan sebagainya.

Prosedur Penelitian

Penyiapan bahan penelitian. Kalus diperoleh dengan menanam setengah anter yang diisolasi dari daerah transisi spadik yang 50% stigmanya berada dalam masa reseptif optimal. Selanjutnya setengah anter ditanam pada medium Winarto dan Rachmawati (MWR). Komponen makro, mikro, vitamin, dan sumber karbon media tersebut menggunakan bahan-bahan murni (pro analisis). Medium Winarto dan Rachmawati yang mengandung 1,5 mg/l tidiazuron (TDZ), 0,75 mg/l 6-benzilaminopurin (BAP), dan 0,02 mg/l asam asetat naftalen (NAA). Medium tersebut dipadatkan dengan 1,8 g/l gelrite (Winarto 2009). Media dipersiapkan dalam botol kultur dengan diameter 5 cm dan tinggi 7 cm. Botol diisi dengan 10 ml MWR. Media disterilisasi pada suhu 121°C, 15 kPa, selama 20 menit. Kultur setengah anter dalam botol selanjutnya diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 24±1°C, selama ± 2 bulan. Kalus yang teregenerasi dipindahkan pada kondisi terang dengan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluorescen 24±1°C dan kelembaban 65±2,5% hingga ukuran kalus bertambah besar (diameter ± 3-5 mm).



Gambar 1. Tiga tipe akar yang dihasilkan dari dua jenis media yang berbeda (A) MW tanpa arang aktif, (B) MW yang ditambah dengan 1% arang aktif, panah merah = tipe akar 1 = akar udara, panah kuning = tipe akar 2, panah putih = tipe akar 3 (*Three type of roots derived from two different culture media (A) MW without activated carchoal, (B) MW supplemented with 1% activated carchoal, red arrows = type 1 of root = air root, yellow arrows = type 2 of root, white arrows = type 3 of root*)

Kalus yang berhasil diregenerasikan sebagian digunakan untuk donor pada analisis kromosom, sebagian disubkulturkan pada media yang sama untuk tujuan perbanyakan kalus pada interval 3 bulan sekali menggunakan medium dan kondisi inkubasi yang sama. Setelah 3-4 kali subkultur, kalus selanjutnya diregenerasi hingga membentuk tunas. Tunas (2-3 daun, tinggi ± 2 cm) dikultur pada medium Winarto (MW). Komponen makro, mikro, vitamin, dan sumber karbon menggunakan bahan murni (Winarto 2009). Medium tersebut ialah medium tanpa hormon yang mengandung 1% arang aktif dan tanpa arang aktif. Kedua perlakuan tersebut untuk menginduksi variasi jenis akar. Media MW juga dipadatkan dengan 1,8 g/l gelrite dengan cara penyiapan yang sama dengan MWR. Kultur diinkubasi di bawah kondisi terang pada kondisi yang sama selama 3 bulan. Akar yang terbentuk selanjutnya digunakan untuk donor eksplan pada uji kromosom.

Aplikasi Metode Pewarnaan Kromosom pada Berbagai Jenis Eksplan

Pada percobaan pertama, jenis eksplan yang digunakan ialah kalus, pucuk tunas, dan ujung akar. Sementara metode penghitungan kromosom yang diaplikasikan ialah modifikasi metode penghitungan jumlah kromosom seperti yang didiskripsikan oleh Fukui (1996) untuk kalus dan daun muda/pucuk tunas yang dimodifikasi dengan pewarnaan aseto-orcein 2% dan penghitungan

jumlah kromosom pada ujung akar (Darnaedi 1991).

Metode Fukui (1996)

Kalus dan ujung tunas dipotong dengan ukuran 0,1-0,3 mm. Eksplan dimasukkan ke dalam larutan 0,02 M 8-hidroksi quinolin selama 2-3 jam pada suhu 18°C, kemudian eksplan dipindahkan ke dalam larutan fiksasi Former's (etanol 100%: asam asetat glasial dengan perbandingan 3:1 v/v) hingga warna hijau kalus atau ujung tunas hilang. Eksplan selanjutnya difiksasi dengan modifikasi larutan Carnoy's (kloroform: alkohol 96%: asam asetat glasial dengan perbandingan 6:3:1 v/v/v) selama 15 menit pada suhu 18°C, kemudian direndam dalam asam asetat 45% selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi campuran asam klorida (HCl) dengan asam asetat glasial 45% perbandingan 3:1 selama 2 menit.

Tahap berikutnya, eksplan dihidrolisis dengan larutan 1N HCl selama 15 menit pada suhu 60°C. Selanjutnya dicat dengan aseto-orcein 2% selama 10 menit. Setelah pengecatan eksplan diletakkan pada gelas obyek yang diberi 1-2 tetes entellan, kemudin ditutup dengan gelas penutup (22 x 22 mm). Eksplan kemudian ditekan dengan ibu jari hingga membentuk lapisan sel yang tipis dan dibiarkan beberapa saat hingga kering. Preparat selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1.000x, dan

diambil gambar terbaik dari hasil pengamatan menggunakan Nikon DX 40.

Metode Darnaedi (1991)

Ujung akar aktif dipanen dari tunas yang berakar, dipotong ± 1 cm dari ujung akar, dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi 0,8 hidroksiquinolin. Akar dibiarkan dalam larutan tersebut selama 3-5 jam pada suhu 20°C. Ujung akar selanjutnya diambil dan dibilas dengan air destilasi hingga bersih. Akar kemudian direndam dalam larutan asam asetat 45% selama 10 menit, dipindahkan dalam larutan 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) dan dibiarkan selama 3 menit dalam *water bath* bersuhu 60°C. Potongan akar selanjutnya dipindahkan ke atas kaca obyek, dibuang tudung akarnya, dan dipotong sepanjang ± 1 mm. Pada potongan akar kemudian ditambahkan 1-3 tetes aseto-orcein dan dibiarkan selama 3 menit. Potongan akar dengan aseto-orcein selanjutnya ditutup dengan kaca penutup, ditekan dengan pensil berkaret/ibu jari tangan (*squashing*) hingga membentuk lapisan sel yang tipis.

Jika hasil pengecatan belum maksimal, kaca penutup dapat diangkat lagi, ditambahkan 1-2 tetes larutan aseto-orcein dan dilakukan *squashing* ulang hingga terbentuk lapisan sel yang sangat tipis dan menyebar secara merata. Preparat selanjutnya difiksasi di atas api beberapa saat. Tepi preparat kemudian ditutup dengan entellan/kutek untuk mencegah awetan menjadi kering. Pada tahap berikutnya, eksplan dihidrolisis dengan larutan 1N HCl selama 15 menit pada suhu 60°C dalam *water bath*. Selanjutnya preparat dicat dengan aseto-orcein 2% selama 10 menit. Setelah pengecatan eksplan diletakkan dalam gelas obyek yang diberi 1-2 tetes entellan, ditutup dengan gelas penutup (22 x 22 mm). Eksplan kemudian ditekan dengan ibu jari hingga membentuk lapisan sel yang tipis dan dibiarkan beberapa saat hingga kering. Preparat selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1.000x, dan diambil gambar terbaik dari hasil pengamatan menggunakan Nikon DX 40.

Seleksi Jenis Akar yang Sesuai untuk Pewarnaan Kromosom

Pada percobaan kedua, tiga jenis akar yang berbeda tipe pertumbuhannya diuji pada tahap ini. Ketiga jenis akar tersebut ialah (1) akar udara (akar yang tumbuh pada ruang udara atau di atas media pertumbuhannya), (2) akar yang tumbuh

di dalam medium tanpa penambahan arang aktif, dan (3) akar yang tumbuh pada medium yang ditambahkan arang aktif (Gambar 1). Metode pewarnaan kromosom yang digunakan ialah medium Darnaedi (1991).

Modifikasi Metode Darnaedi (1991) dalam Pewarnaan Kromosom

Metode penghitungan jumlah kromosom Darnaedi (1991) pada ujung akar yang memberikan hasil terbaik pada percobaan pertama dimodifikasi untuk meningkatkan kualitas hasil pewarnaan kromosom. Metode Darnaedi (1991) tanpa modifikasi digunakan sebagai kontrol (Metode I). Modifikasi metode Darnaedi (1991) dengan pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) selama 10 menit dan perlakuan aseto-orcein selama 15 menit (Metode II), dan modifikasi metode Darnaedi (1991) dilakukan dengan merendam ujung akar dalam 0,002 M hidroksiquinolin selama 24 jam pada suhu $\pm 20^\circ\text{C}$, pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) selama 10 menit dan perlakuan aseto-orcein selama 2 jam (Metode III).

Pada ketiga percobaan, tiap perlakuan terdapat 50 sampel yang diuji dan tiap sampel terdapat 1-3 eksplan/akar yang dianalisis dan diamati. Perubahan yang diamati dalam penelitian ini ialah (1) kategori hasil pewarnaan dengan (a) sel tanpa kromosom, (b) sel + kromosom yang tidak jelas dan tidak dapat dihitung, (c) sel + kromosom agak jelas dan dapat dihitung, (d) sel + kromosom yang jelas dan mudah dihitung dan (2) variasi ploidi dan jumlah kromosom. Jumlah kromosom ditentukan dari 10 kali pengamatan pada tiap sampel di bawah bidang pandang yang berbeda. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1.000x, dan pengambilan gambar kromosom terbaik dilakukan menggunakan Nikon DX 40.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aplikasi Metode Pewarnaan Kromosom pada Berbagai Jenis Eksplan

Dari hasil pewarnaan kromosom diketahui bahwa penggunaan kalus dan pucuk tunas sebagai sumber eksplan tidak menghasilkan pewarnaan yang maksimal. Pada eksplan kalus, sel-sel yang di cat dengan aseto-orcein tidak menghasilkan

pewarnaan yang jelas, sedangkan pada sel-sel yang sedang mengalami pembelahan mitosis, kromosom hanya terlihat berupa titik-titik ungu yang menyebar dalam sel (Gambar 2A). Kondisi ini menyebabkan penghitungan jumlah kromosom sulit dilakukan. Titik-titik ungu tersebut diduga merupakan kromosom yang memendek. Hasil yang hampir sama juga ditemukan pada eksplan pucuk tunas. Pada sel-sel yang mengalami mitosis, kromosom juga hanya terlihat berupa titik-titik ungu yang tersebar dan kurang jelas (Gambar 2B). Sementara sel-sel dengan kromosom yang agak jelas ditemukan pada ujung akar sebagai donor eksplan (Gambar 2C).

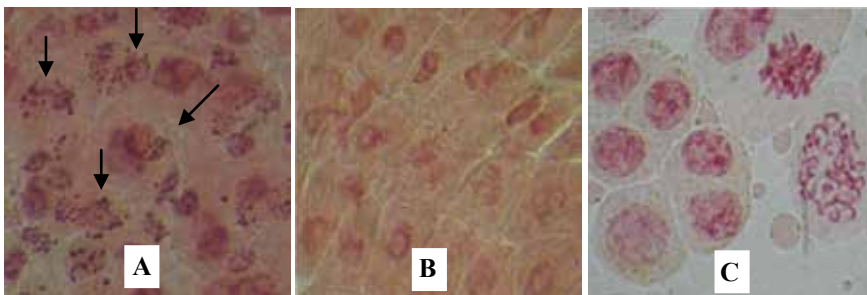
Hasil studi *in vitro* pada eksplan hasil kultur anter *Anthurium* memberi bukti bahwa pemanfaatan kalus dan pucuk tunas tidak sesuai digunakan sebagai donor eksplan dalam penentuan level ploidi eksplan. Titik-titik kromosom yang tersebar dalam sel atau lebih dikenal dengan mosaik kromosom merupakan hasil utama yang dapat diamati di bawah mikroskop pada kedua eksplan. Oleh karena itu dari 50 eksplan yang diuji, 30-60% eksplan terdapat sel yang mengalami mitosis, tetapi jumlah kromosom tidak jelas dan sulit dihitung (Tabel 1).

Sementara pada eksplan ujung akar, meski peluang menemukan sel dengan kromosom yang agak jelas dan dapat dihitung hanya 30% dari total eksplan yang diamati, tetapi kategori hasil pewarnaan menunjukkan kondisi yang lebih baik dibanding dua eksplan yang lain. Hasil ini belum optimal, sehingga perlu upaya optimasi teknik

pewarnaan kromosom pada satu atau dua tahap perlakuan dari keseluruhan tahapan pada metode Darnaedi (1991). Modifikasi metode uji kromosom menggunakan ujung akar perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Selanjutnya dari 15 sampel yang dapat dihitung jumlah kromosomnya terdapat lima sampel yang diketahui tingkat ploidinya yaitu haploid dan sisanya ialah diploid dengan rasio ploidi 33,3:66,7% (Tabel 2).

Seleksi Jenis Akar yang Sesuai untuk Pewarnaan Kromosom

Tidak semua jenis akar yang dihasilkan pada kultur *in vitro* tunas menghasilkan pewarnaan yang optimal dan penghitungan jumlah kromosom yang tepat. Berdasarkan jumlah sel + kromosom yang dapat diamati dan dihitung, akar yang dipersiapkan melalui penanaman tunas pada medium yang mengandung 1% arang aktif merupakan akar yang paling maksimal digunakan sebagai sumber eksplan dalam pengujian kromosom. Akar jenis ini umumnya lunak, memiliki daerah aktif tumbuh yang lebih panjang, berwarna kuning, mudah difiksasi, dimaserasi, dan dicat dengan baik pada penyiapan preparat pewarnaan kromosom. Persentase keberhasilan jenis akar ini dalam uji kromosom berkisar antara 12-46% dari total sampel (50 eksplan) dengan nilai rerata mencapai 33,4% (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan nilai pengamatan tertinggi dibanding jenis akar yang lain. Hasil terbaik berikutnya ditemukan pada akar udara dengan rerata persentase keberhasilan mencapai 2%.



Gambar 2. Hasil pewarnaan kromosom pada eksplan yang berbeda. (A) Hasil pewarnaan kromosom pada eksplan kalus, (B) Hasil pewarnaan kromosom pada eksplan pucuk tunas, (C) Hasil pewarnaan kromosom pada eksplan ujung akar, Panah hitam = mosaik kromosom (*Chromosome staining results on different explants, (A) Chromosome staining result on callus explant, (B) Chromosome staining result on shoot tip explant, (C) Chromosome staining result on root tip explant, Black arrows = mosaic chromosomes*)

Tabel 1. Pengaruh sumber eksplan yang berbeda terhadap kualitas hasil pewarnaan kromosom (*Effect of different explant sources on quality result of chromosome staining*)

Jenis eksplan (<i>Type of explant</i>)	Hasil pewarnaan kromosom (<i>Results of chromosome staining</i>)			
	Sel tanpa kromosom (<i>Cell without chromosome</i>)	Sel + kromosom tidak jelas dan sulit dihitungkan (<i>Cell with unclear difficult counted chromosome</i>)	Sel+kromosom agak jelas dan dapat dihitungkan (<i>Cell with clearer and counted chromosome</i>)	Sel+kromosom jelas dan mudah dihitungkan (<i>Cell with clear and easy counted chromosome</i>)
Kalus (<i>Callus</i>)	20 (35%)	30 (60%)	-	-
Pucuk tunas (<i>Shoot tip</i>)	35 (70%)	15 (30%)	-	-
Ujung akar (<i>Root tip</i>)	15 (30%)	20 (40%)	15 (30%)	-

Keterangan: Total eksplan yang diuji dan diamati ialah 50 eksplan (*Total of explants tested and observed was 50 explants*)

Akar yang tumbuh dalam medium tanpa 1% arang aktif merupakan jenis eksplan yang tidak sesuai untuk uji kromosom. Akar jenis ini umumnya sangat sedikit atau bahkan tidak memiliki area tumbuh aktif pada bagian ujungnya dan menjadi lebih keras ketika mengalami proses pewarnaan. Akibatnya proses fiksasi, maserasi sel hingga pewarnaan akar tidak berjalan dengan baik. Preparat tetap tebal dan sulit membentuk lapisan tipis saat ditekan (Gambar 3A). Jika ada yang dapat terproses dengan baik, sel-sel yang mengalami mitosis dengan kromosom yang terwarnai sulit ditemukan (Gambar 3B). Kondisi ini menyebabkan pewarnaan dan penghitungan jumlah kromosom tidak berhasil dilakukan (Tabel 3). Berdasarkan jumlah eksplan yang dapat dihitungkan, jumlah kromosom pada percobaan kedua juga diketahui adanya variasi level dan rasio ploidi pada regenerasi hasil kultur anter *Anthurium* (Tabel 4).

Modifikasi Metode Darnaedi (1991) dalam Pewarnaan Kromosom

Modifikasi metode Darnaedi (1991) untuk pewarnaan dan penghitungan jumlah kromosom pada studi ini belum menunjukkan hasil yang maksimal, meskipun terdapat peningkatan

jumlah sel + kromosom yang dapat diamati dan dihitungkan dengan mudah. Pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) selama 10 menit dan perlakuan aseto-orcein selama 15 menit (metode II) merupakan metode yang lebih baik dalam pewarnaan kromosom skala in vitro (Tabel 5), meskipun hanya mampu meningkatkan jumlah sel dengan kromosom yang dapat dihitungkan hingga 5% saja. Perlakuan 0,002 M hidroksiquinolin selama 24 jam, pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) selama 10 menit dan perlakuan aseto-orcein selama 2 jam (Metode III) menurunkan kualitas hasil pewarnaan kromosom. Pada percobaan ketiga variasi level dan rasio ploidi regenerasi juga ditemukan (Tabel 6).

Dari percobaan 1, 2, dan 3 diketahui bahwa kultur anter *Anthurium* menghasilkan regenerasi dengan level ploidi yang bervariasi. Dari total eksplan yang berhasil dihitungkan, jumlah kromosomnya (86 eksplan) diketahui 29 (33,5%) haploid, 53 (62,7%) diploid, dan 4 (5,7%) triploid. Pada eksplan haploid, jumlah kromosom bervariasi antara 15-20 dengan rerata $17 \pm 2,6$ kromosom per sel, pada eksplan diploid berkisar antara 28-34 dengan $31 \pm 2,8$ kromosom per sel, sedangkan pada eksplan triploid jumlah kromosom berkisar antara 45-53 dengan rerata

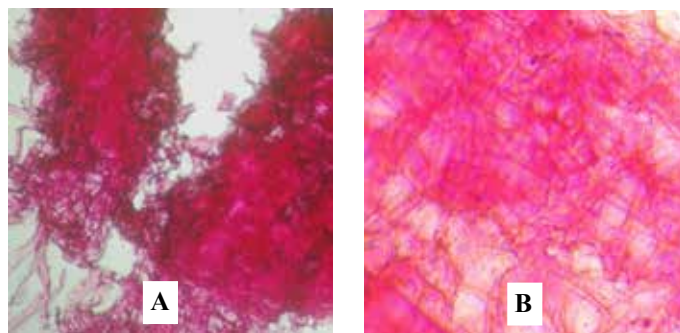
Tabel 2. Variasi level dan rasio ploidi pada 15 eksplan ujung akar yang dapat dihitungkan jumlah kromosomnya (*Variation of ploidy level and ratio on 15 root tip explants that can be counted their chromosome number*)

Jenis eksplan (<i>Type of explant</i>)	Rasio level ploidi (<i>Ploidy level ratio</i>)		
	Haploid	Diploid	Triplet
Kalus (<i>Callus</i>)	-	-	-
Pucuk tunas (<i>Shoot tip</i>)	-	-	-
Ujung akar (<i>Root tip</i>)	5	10	-
Rasio ploidi (<i>Ploidy ratio</i>), %	33,5	66,7	-

Total eksplan yang diamati ialah 15 eksplan, jumlah kromosom ditentukan dari 10 kali pengamatan pada tiap sampel pada bidang pandang yang berbeda. (*Total of explants observed was 15 explants, chromosome number was determined from 10 times observation in each explant in different observation views*)

Tabel 3. Pengaruh tipe akar yang berbeda terhadap kualitas hasil pewarnaan kromosom (Effect of different type of root tips on quality result of chromosome staining)

Jenis eksplan (Type of explant)	Kategori hasil pewarnaan kromosom (Category of chromosome staining results)			
	Sel tanpa kromosom (Cell without chromosome)	Sel + kromosom tidak jelas dan sulit dihitug (Cell with unclear, difficult counted chromosome)	Sel+kromosm agak jelas dan dapat dihitug (Cell with clearer and counted chromosome)	Sel+kromosom jelas dan mudah dihitug (Cell with clear and easy counted chromosome)
Akar udara (Air root)	44,3 (88,7%)	4,0 (8,0%)	1,7 (3,3%)	-
Akar tanpa arang aktif (Root without activated carchoal)	50,0 (100%)	-	-	-
Akar + arang aktif (Root with activated carchoal)	16,7 (33,4%)	16,7 (33,4%)	13,0 (26,0%)	3,7 (7,4%)



Gambar 3. Hasil pewarnaan kromosom pada akar yang tumbuh pada medium tanpa arang aktif (A) lapisan sel-sel ujung akar yang tebal, (B) lapisan sel-sel ujung akar yang lebih tipis, tetapi sel yang mengalami mitosis tidak ditemukan (Chromosome staining results on root grown on medium without activated carchoal (A) thick layer of root tip cells, (B) thinner layer of root tip cells without cell in mitosis condition)

Tabel 4. Variasi level dan rasio ploidi pada 18 eksplan ujung akar yang dapat dihitug jumlah kromosomnya (Variation of ploidy level and ratio on 18 root tip explants that can be counted their chromosome number)

Jenis eksplan (Type of explants)	Rasio jumlah eksplan pada masing-masing level ploidi (Explant number ratio on each ploidy level)		
	Haploid	Diploid	Triploid
Akar (Roots)	6	11	1
Rasio ploidi (Ploidy ratio), %	33,3	61,7	5,6

Total eksplan yang diamati ialah 18 eksplan, jumlah kromosom ditentukan dari 10 kali pengamatan pada tiap sampel pada bidang pandang yang berbeda. (Total of explants observed was 18 explants, chromosome number was determined from 10

49±4,2 kromosom per sel. Meskipun rasio level ploidi eksplan belum mampu memberikan gambaran ril variasi ploidi regeneran, adanya variasi level dan rasio ploidi juga ditemukan pada regeneran kultur anter *Anthurium* (Gambar 4).

Pewarnaan kromosom pada penelitian ini didasarkan pada kondensasi pola kromosom pada tahap mitosisnya, seperti daerah heterokromatin, konstiksi, nukleolar, dan lain-lain (Noguchi

dan Tanaka 1981) dan aseto-orcein digunakan sebagai pewarnanya (Sharma dan Sharma 1994). Pewarnaan kromosom menggunakan aseto-orcein sampai saat ini tetap diaplikasikan pada banyak tanaman untuk penentuan level ploidi dan studi kariotipe (Sharma dan Sharma 1999), karena hasil yang dapat dipercaya, gambar yang tajam dengan kontras yang tinggi, cepat, dan sederhana prosesnya (Taniguchi 1996, Sharma dan Sharma

Tabel 5. Pengaruh modifikasi metode pewarnaan kromosom Darnaedi (1991) terhadap kualitas hasil pewarnaan kromosom (*Effect of modification of Darnaedi's chromosome staining method on quality result of chromosome staining*)

Metode (Method)	Hasil pewarnaan kromosom (<i>Results of chromosome staining</i>)			
	Sel tanpa kromosom (Cell without chromosome)	Sel + kromosom tidak jelas dan sulit dihitung (Cell with unclear difficult counted chromosome)	Sel+kromosm agak jelas dan dapat dihitung (Cell with clearer and counted chromosome)	Sel+kromosom jelas dan mudah dihitung (Cell with clear and easy counted chromosome)
I	13 (26%)	18 (36%)	15 (30%)	6 (8%)
II	12 (24%)	15 (30%)	17 (34%)	6 (12%)
III	25 (50%)	17 (34%)	7 (14%)	1 (2%)

Keterangan: + = dengan. Total eksplan yang diuji dan diamati ialah 50 eksplan (*Total of explants tested and observed was 50 explants*)

1999). Pada teknik ini kromosom tercatat ungu tua gelap, sedangkan sitoplasmanya berwarna pucat transparan (Sharma dan Sharma 1994 dan 1999).

Keberhasilan aplikasi metode pewarnaan aseto-orcein dalam pewarnaan kromosom dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya pemilihan eksplan/donor uji kromosom, praperlakuan, fiksasi, maserasi, pewarnaan, dan proses penyelesaiannya (Taniguchi 1996, Sharma dan Sharma 1994 dan 1999). Kesesuaian setiap faktor dalam proses pewarnaan dapat menghasilkan gambar kromosom yang jelas dengan kontras yang tinggi. Dalam penelitian ini terbukti bahwa tidak setiap eksplan memberikan hasil yang sama dalam pewarnaan kromosom. Dari tiga eksplan yang dipelajari, hanya eksplan ujung akar yang memberikan hasil pewarnaan yang paling baik.

Pada eksplan kalus, hasil pewarnaan kromosom yang berupa titik-titik ungu gelap dan tersebar dalam sel dikenal sebagai mosaik kromosom. Penelitian Cavallini dan Lupi (2006) pada bunga matahari menunjukkan bahwa kondisi ini disebut dengan mosaik kromosom (*aneusomary*). Mosaik kromosom juga ditemukan pada pucuk tunas,

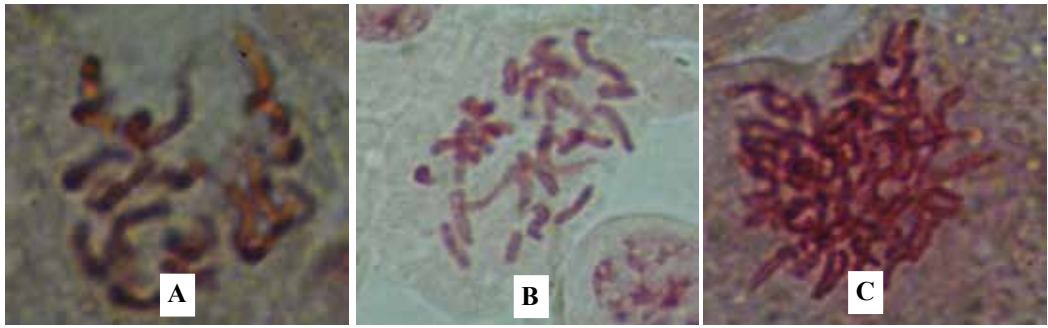
meskipun tidak teramati dengan jelas. Jumlah kromosom bervariasi dari satu sel ke sel yang lain pada penelitian lain terjadi akibat perlakuan hormon pertumbuhan (Mehra dan Anand 2006) khususnya 2,4-D pada konsentrasi yang tinggi (Dolezel dan Novak 1984, Dolezel *et al.* 1987, Jin *et al.* 2008), periode subkultur dan inkubasi kalus (Bouman dan De Klerk 2001). Variasi kromosom tersebut disebabkan oleh endoreduplikasi, endomitosis, susunan mikrotubul yang abnormal, kerusakan mikrotubul, dan metilasi DNA (Fras *et al.* 2007, Pietsch dan Anderson 2007). Kondisi-kondisi tersebut pada gilirannya menyebabkan terjadinya variasi ploidi regenerasi (Reuther dan Becker 1985, Fras dan Maluszynska 2004).

Variasi somaklonal yang dihasilkan dalam kultur kalus diketahui juga berkaitan erat dengan aktivitas mitosisnya. Hasil penelitian Cellarova *et al.* (2004) mengungkapkan bahwa profase merupakan aktivitas mitosis dominan yang terjadi pada kultur kalus, metafase, dan telofase berada pada frekuensi yang rendah, sedangkan anafase sangat jarang terjadi. Pada pertumbuhan kalus yang cepat, sel-sel dalam kalus juga membelah secara aktif dan lebih cepat dibanding kondisi normalnya. Pembelahan sel yang

Tabel 6. Variasi level dan rasio ploidi pada 53 eksplan ujung akar yang dapat dihitung jumlah kromosomnya (*Variation of ploidy level and ratio on 53 root tip explants that can be counted their chromosome number*)

Jenis eksplan (<i>Type of explant</i>)	Rasio ploidi (<i>Ploidy ratio</i>)		
	Haploid	Diploid	Triploid
Akar (<i>Roots</i>)	18	32	3
Rasio ploidi (<i>Ploidy ratio</i>), %	33,9	60,4	5,7

Total eksplan yang diamati ialah 53 eksplan. Jumlah kromosom ditentukan dari 10 kali pengamatan pada tiap sampel pada bidang pandang yang berbeda. (*Total of explants observed was 53 explants, chromosome number was determined from 10 times observation in each explant in different observation views*).



Gambar 4. Variasi level ploidi pada eksplan hasil kultur anter *Anthurium*, (A) sel haploid dengan $n = x = 17$, (B) sel diploid dengan $2n = 2x = 33$, (C) sel triploid dengan $2n = 3x = 47$ (Variation of ploidy level of explant derived from anther culture of *Anthurium*. (A) Haploid cell with $n = x = 17$, (B) diploid cell with $2n = 2x = 33$, (C) triploid cell with $2n = 3x = 47$)

cepat tersebut menyebabkan sel berada dalam ketidakseimbangan aktivitas mitosis, yang pada gilirannya menyebabkan terjadinya variasi jenis kalus dan respons organogenesisnya (Boumann dan De Klerk 2001). Variasi somaklonal pada kultur anter *Anthurium* juga terbukti dengan ditemukannya kalus yang tumbuh cepat dan mudah diregenerasi membentuk tunas, kalus tumbuh lambat dan sulit diinduksi membentuk tunas, dan kalus yang sangat sulit diregenerasi (Rachmawati *et al.* 2007), seperti terjadi pada kapas (Jin *et al.* 2008).

Akar merupakan eksplan yang sesuai untuk uji kromosom, tetapi kualitasnya sebagai donor uji kromosom dapat ditingkatkan dengan adanya penambahan arang aktif dalam media kultur. Sebagian besar akar yang ditumbuhkan dalam media yang ditambah arang aktif (jenis 3) yang dicat dengan aseto-orcein menghasilkan gambar kromosom yang paling baik dibanding dua akar yang lain (tipe 1 dan 2). Hasil ini sekaligus memperkuat hasil studi sebelumnya bahwa penambahan arang aktif dalam media dapat meningkatkan kualitas akar yang dihasilkan seperti yang juga dilaporkan pada *Dendrobium* (Martin *et al.* 2005), Lilium (Thao *et al.* 2006), dan anggrek terrestrial (Temjensangba 2006). Akar-akar tersebut sesuai untuk donor eksplan yang baik dalam pewarnaan kromosom.

Metode pewarnaan Darnaedi (1991) merupakan metode uji yang paling potensial dalam pewarnaan kromosom pada level in vitro. Metode tersebut mencakup praperlakuan eksplan

dengan hidroksiquinolin, fiksasi menggunakan asam asetat 45%, maserasi menggunakan kombinasi 1 N HCl: asam asetat 45%, pewarnaan menggunakan aseto-orcein 2%, dan *squashing* eksplan. Metode tersebut memberikan gambar kromosom yang paling baik dibanding metode Fukui (1996). Hasil pewarnaan yang lebih baik diperoleh dengan memperpanjang waktu pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) dari 3 menjadi 10 menit dan perlakuan aseto-orcein dari 1-2 menit menjadi 15 menit. Meskipun perbaikan belum maksimal, metode ini berpeluang mendapatkan gambar kromosom yang lebih jelas. Perbaikan teknik pewarnaan guna mendapatkan hasil yang lebih baik juga dilakukan pada almond melalui penyimpanan akar pada air dingin suhu 0°C selama 4 hari, perlakuan kolkisin 0,2% pada suhu 5°C selama 3 hari (Martinez-Gomez *et al.* 2005). Dua tahap pewarnaan dengan AA 60% yang didinginkan pada suhu -80°C selama 5 menit berhasil diaplikasikan pada stroberi (Nathewet *et al.* 2009). Nathewet *et al.* (2007) melakukan perbaikan metode pewarnaan kromosom dengan memberi perlakuan larutan enzim selama 25 menit pada suhu 42°C untuk maserasi sampel.

Variasi ploidi pada regenerasi hasil kultur anter juga ditemukan pada eksplan/planlet hasil kultur anter *Anthurium* dengan rasio ploidi 33,5% haploid, 62,7% diploid, dan 5,7% triploid. Ini memberi bukti bahwa variasi ploidi regenerasi merupakan ciri umum regenerasi yang dihasilkan melalui kultur anter, seperti yang dilaporkan

pada lili (Han *et al.* 1997), bunga matahari (Saji dan Sujatha 1998), dan *Solanum commersonii* (Cardi *et al.* 1993) dengan rasio ploidi yang berbeda. Pada kultur anter *Lilium* dihasilkan lima regeneran haploid, dua diploid, dan empat mixoploid (Han *et al.* 1997), pada bunga matahari 8,3% regeneran haploid dan 91,7% diploid (Saji dan Sujatha 1998), dan pada kentang 60% diploid dan 40% tetraploid (Cardi *et al.* 1993). Variasi tersebut umumnya terkait dengan regenerasi eksplan melalui kalus, aplikasi hormon, dan aktivitas subkultur berulang.

Ditemukannya regeneran haploid melalui pewarnaan aseto-orcein pada studi ini memiliki arti yang sangat penting dalam pengembangan teknologi haploid *Anthurium*. Perbanyak regeneran haploid pada tahap selanjutnya akan mempersiapkan ketersediaan tunas-tunas haploid untuk tujuan penggandaan kromosom. Dari penggandaan kromosom dapat dihasilkan regeneran haploid ganda. Tanaman haploid ganda inilah yang memiliki arti penting dalam perbenihan dan pemuliaan *Anthurium*.

KESIMPULAN

1. Ujung akar dan akar yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung 1% arang aktif merupakan jenis eksplan dan akar yang sesuai untuk mendapatkan hasil pewarnaan kromosom yang baik pada level *in vitro*.
2. Modifikasi metode pewarnaan kromosom Darnaedi (1991) dengan pemanasan ujung akar pada 1N HCl : asam asetat 45% (3:1, v/v) selama 10 menit dan perlakuan aseto-orcein selama 15 menit merupakan metode yang lebih sesuai untuk mendapatkan hasil pewarnaan kromosom pada eksplan ujung akar.
3. Kultur anter *Anthurium* menghasilkan regeneran yang bervariasi ploidinya yaitu 33,5% haploid, 62,7% diploid, dan 5,7% triploid.

SARAN

Modifikasi metode Darnaedi (1991) untuk pewarnaan kromosom hasil penelitian ini masih dapat diperbaiki untuk meningkatkan hasil pewarnaannya. Perbaikan dapat dilakukan dengan

memperhatikan ukuran eksplan, waktu maserasi, jenis cat, dan waktu pengecatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Budi Marwoto, MS, APU dan *reviewer J.Hort.* yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang sangat berguna bagi perbaikan naskah ini.

PUSTAKA

1. Bouman, H. and G.J. De Klerk. 2001. Measurement of the Extent of Somaclonal Variation in Begonia Plants Regenerated under Various Conditions. Comparison of Three Assays *Theor. Appl Genet.* 102(1): 111-117.
2. Cardi T., V. Iannamico, F. D'ambrosio, E. Filippone, and P.F. Lurquin. 1993. In Vitro Regeneration and Cytological Characterization of Shoots from Leaf Explants of Three Accessions of *Solanum commersonii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 34(1): 107-114.
3. Cavallini, A. and M.C. Lupi. 2006. Cytological Study of Callus and Regenerated Plants of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Plant Breed.* 99: 203-238
4. Cellarova, E., M. Rychlova, A. Seidelova., and R. Honcriv. 2004. Comparison of Mitotic Activity and Growth in Two Long Term Callus Cultures of *Matricaria recutita* L. *Acta Biotech.* 10(3): 245-251
5. Darnaedi, D. 1991. Informasi Kromosom. *Pelatihan Sitogenetika*. PAU Ilmu Hayat, IPB. 5 November 1991. Bogor. 15 Hlm.
6. Dolezel, J. and F. J. Novak. 1984. Cytogenetic Effect of Plant Tissue Culture Medium with Certain Growth Substances on *Allium sativum* L. Meristem Root Tip Cells. *Biol Plant.* 26(4):293-298
7. _____, S. Lucetti, and F. J. Novák. 1987. The Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Cell Cycle Kinetics and Sister-Chromatid Exchange Frequency in Garlic (*Allium sativum* L.) Meristem Cells. *Biol Plant.* 29(4): 253-257.
8. Fras, A. and J. Maluszynska. 2004. The Correlation Between the Chromosome Variation in Callus and Genotype of Explants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetica.* 121(2): 45-154.
9. Fukui, K. 1996. *Plant Chromosomes at Mitosis*. In: Fukui, K. and S. Nakayama (Eds.) *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. CRC Press. Boca Raton. pp 1-18.
10. Han, D.S., Y. Niimi, and M. Nakano. 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of the Asiatic Irbid Lily Connecticut King. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 47: 153-158.
11. Jin, S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang, and X. Zhang. 2008. Detection of Somaclonal Variation of Cotton (*Gossypium hirsutum*) Using Cytogenetics, Flow Cytometry, and Molecular Markers. *Plant Cell Reps.* 27(8):1303-1316.

12. Juchimiuk, J., D. Siwinska, and J. Maluszynska. 2007. Cytological Events in Explants of *Arabidopsis thaliana* During Early Callogenesis. *Plant Cell Reps.* 26(11): 1933-1939.
13. Kaneko, K. and H. Kamemoto. 1978. Cytological Studies of Kaumana and Uniwa *Anthurium*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103:699-701.
14. Martin, K.P., J. D. Geevarghese, and J. Madassery. 2005. In Vitro Propagation of *Dendrobium* Hybrids Using Flower Stalk Node Explants. *Indian J. Exp Biol.* 43(3): 280-285.
15. Martinez-Gomez, P., R. Sanchez-Perez, Y. Vaknin, F. Dicenta, and T.M. Gradziel. 2005. Improved Technique for Counting Chromosomes in Almond. *Sci.Hort.* 105(1): 139-143.
16. Marutani, M. and H. Kamemoto. 1983. Transmission and Significance of B Chromosomes in *Anthurium waroqueanum*. *Am. J. Bot.* 70:40-46.
17. _____, R.D. Sheffer, and H. Kamemoto. 1993. Cytological Analysis of *Anthurium andraeanum* (Araceae), Its Related Taxa and Their Hybrids. *Am. J. Bot.* 80: 93-103.
18. Mehra, P.N. and M. Anand. 2006. Callus of *Pinus roxburghii* (Chir pine) and Its Cytology. *Physiol Plant.* 58(3): 282-286
19. Nathewet, P., T. Yanagi, K. Sone, S. Taketa, and N. Okuda. 2007. Chromosome Observation Method at Metaphase and Pro-metaphase Stages in Diploid and Octoploid Strawberries. *Sci. Hort.* 144(2):133-137.
20. _____, Y. Iwastubo, K. Sone, T. Takamura, and N. Okuda. 2009. Improvement of Staining Method for Observation of Mitotic Chromosomes in Octoploid Strawberry Plants. *Sci. Hort* 120(3): 431-435.
21. Noguchi, J. and R. Tanaka. 1981. C-banding after Aceto-orcein Staining for Plant Chromosomes. *Jpn. J. Genet.* 56:529
22. Pietsch, G.M. and N.O. Anderson. 2007. Epigenetic Variation in Tissue Cultured *Gaura lindheimeri*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 89(2-3): 91-103
23. Saji, K.V. and M. Sujatha. 1998. Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 103: 1-7.
24. Sheffer, R.D. and T.B. Croat. 1983. Chromosome Numbers in the Genus *Anthurium* (Araceae) II. *Am. J. Bot.* 70:858-871.
25. Sharma, A.K. and A. Sharma. 1994. *Chromosome Techniques-A Manual*. Harwood Academic Publisher. Australia. 368 p.
26. _____. 1999. *Plant Chromosomes: Analysis, Manipulation, and Engineering*. Harwood Academic Publisher. France. 371 p.
27. Rachmawati, F., B. Winarto, dan A. Purwito. 2007. Analisis Ploidi Regeneran Hasil Kultur Anter *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre Kultivar Tropical. *J. Hort. Edisi Khusus* (2): 127-137.
28. Reuther, G. and U. Becker 1985. Relationships Between Ploidy Variations and Organogenic Potency in Long-term Callus Cultures of *Asparagus officinale*. *ISHS Acta Hort.* 212: *Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants*. www.actahort.org/org/members/showpdf?Booknrarnr=212_23. [20 July 2009]
29. Taniguchi, K. 1996. *Plant Chromosome at Metabolic Phase*. In: Fukui, K. and S. Nakayama (Eds.) *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. pp: 35-50
30. Temjensangba, D.C.R. 2006. In Vitro Propagation of Threatened Terrestrial Orchid, *Malaxis Khasiana* Soland ex. Swartz Through Immature Seed Culture. *Indian J. Exp. Biol.* 44(9):672-676.
31. Thao, N.T.P., N.Q. T. Hoang, and T. Mai. 2006. Rapid Propagation of *Lilium formolongi* by In Vitro Culture Technique. *TC Cong Nghe Sinh Hoc.* 4(1): 117-123.
32. Winarto, B. 2009. *Androgenesis: A Breakthrough Effort for Preparing Haploid or Double-haploid Plants in Anthurium*. *Dissertation*. Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture. Bogor Agriculture Institute. 235 p.